

中枢神経における ADP リボシル化因子及び ADP リボシル化因子特異的 GDP/GTP 交換蛋白質の発現に関する研究

著者	鈴木 一郎
号	1965
発行年	2003
URL	http://hdl.handle.net/10097/22457

氏 名（本籍）	すず 鈴 き 木 いち 一 ろう 郎
学 位 の 種 類	博 士 （ 医 学 ）
学 位 記 番 号	医 博 第 1 9 6 5 号
学位授与年月日	平 成 15 年 3 月 24 日
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研 究 科 専 攻	東北大学大学院医学系研究科 （博士課程）医科学専攻
学 位 論 文 題 目	中枢神経における ADP リボシル化因子及び ADP リボシル化因子特異的 GDP/GTP 交換蛋白質の 発現に関する研究
論文審査委員	(主 査) 教授 糸 山 泰 人 教授 田 村 眞 理 教授 八重樫 伸 生

論文内容要旨

研究目的

ADP リボシル化因子 (ARF) は低分子量 GTP 結合蛋白質で, ARF に特異的な GDP/GTP 交換蛋白質 (ARF-GEP) により活性化され, 細胞内膜輸送, 細胞骨格の再編成, リン脂質代謝酵素の活性化などの重要な機能に関与している。これらの機能は中枢神経系においては, 神経細胞が神経伝達物質の輸送を行う際や神経突起を伸長する際に活発に働いていると予想されるが, ARF, ARF-GEP についての機能的意義については殆ど知られていない。構造的, 機能的に著しく多様性を示す脳において各部の遺伝子発現局在を明確にすることにより, 中枢神経系におけるこれらの分子の機能を検討することを目的とした。

研究方法

既報の核酸配列 (ラットの配列が未知であるものはクローニングにより得られた核酸配列) を基に, 各々の分子に特異的なオリゴヌクレオチドプローブを作製し, ノザンブロット法でプローブの特異性を確認した後, 遺伝子組織化学法を用いて, ラット脳発達過程及び舌下神経切断モデルにおける 6 種の ARF と 6 種の ARF-GEP アイソフォームの遺伝子発現を検討した。ARF-GEP の一つである ARF6 特異的交換因子 (EFA6) については, 遺伝子細胞化学法を用いて培養海馬神経細胞内における mRNA 発現局在, 蛍光タンパク・強制発現系を用いて PC12 細胞におけるタンパク局在についても検討した。

研究結果

各々の ARF 及び ARF-GEP が胎生期から成獣期の発達過程において灰白質に時間的・空間的多様性を有しながら特異的な発現を示すこと, 切断側舌下神経核において 2 種の ARF が一過性の遺伝子発現増強を示すことを明らかにした。また, EFA6 の mRNA は樹状突起から成る海馬・歯状回分子層およびに培養海馬神経細胞の細胞体から離れた神経突起にも mRNA の局在が観察された。EFA6 タンパクは, 神経分化誘導をうけた PC12 細胞の細胞膜, 神経突起に ARF6 と一致する局在を認めた。

結論

ARF および ARF-GEP アイソフォームは, 脳発達過程で, 特に灰白質において分子特異的に別々の機能を担うこと, ARF は神経傷害時に特異的な機能を担うことが示唆された。また, EFA6 の mRNA は神経樹状突起にも局在することを明らかにし, そのタンパクは神経細胞の膜,

神経突起で ARF6 と共役して機能していることが示唆された。

研究の意義・独創的な点

各々の ARF 及び ARF-GEP が中枢神経発達過程において、また ARF が神経傷害時において、特異的な機能を有することを示唆した点で意義があると考えられる。また、mRNA が神経樹状突起に局在する現象はシナプス長期増強との関連なども示唆されており、さらにこの現象を示す分子はごく少数しか同定されていないことから、EFA6 の mRNA が樹状突起に局在することを明らかにしたことは意義深いと考える。

審 査 結 果 の 要 旨

ADP リボシル化因子 (ARF) は低分子量 GTP 融合蛋白質で, ARF に特異的な GDP/GTP 交換蛋白質 (ARF-GEP) により活性化され, 中枢神経系においては, 神経細胞が神経伝達物質の輸送を行う際や神経突起を伸長する際に活発に働いていると予想されるが, ARF, ARF-GEP についての機能的意義については殆ど知られていない。構造的, 機能的に著しく多様性を示す脳において各部の遺伝子発現局在を明確にすることにより, 中枢神経系におけるこれらの分子の機能を検討することを目的とした。

既報の核酸配列を基に, 各々の分子に特異的なオリゴヌクレオチドプローブを作製し, ノザンプロット法でプローブの特異性を確認した後, 遺伝子組織化学法を用いて, ラット脳発達過程及び, 舌下神経切断モデルにおける 6 種の ARF と 6 種の ARF-GEP アイソフォームの遺伝子発現を検討した。ARF-GEP のひとつである ARF6 特異的交換因子 (EFA6) については, 遺伝子細胞化学法を用いて培養海馬神経細胞内における mRNA 発現局在, 蛍光タンパク・強制発現系を用いて PC12 細胞におけるタンパク局在についても検討した。

その結果, 各々の ARF 及び ARF-GEP が胎生期から成獣期の発達過程において灰白質に時間的・空間的多様性を有しながら特異的な発現を示すこと, 切断側舌下細胞核において 2 種の ARF が一過性の遺伝子発現増強を示すことを明らかにした。また, ERA6 の mRNA は樹状突起から成る海馬・歯状回分子層およびに培養海馬神経細胞の細胞体から離れた神経突起にも mRNA の局在が観察された。EFA6 タンパクは分化誘導をうけた PC12 細胞の細胞膜, 神経突起に ARF6 と一致する局在を認めた。

ARF および ARF-GEP アイソフォームは脳発達過程で, 特に灰白質において分子特異的に別々の機能を担うこと, ARF は神経障害時に特異的な機能を担うことが示唆された。また EFA6 の mRNA は神経樹状突起にも局在することを明らかにし, そのタンパクは神経細胞の膜, 神経突起で ARF6 と共役して機能していることを示唆した点などで意義があり, 学位に値する研究と考える。